

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR04/003397

International filing date: 28 December 2004 (28.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0315560
Filing date: 30 December 2003 (30.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 18 March 2005 (18.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU

30 DEC 2003

75 INPI PARIS 34 5P

N° D'ENREGISTREMENT

0315560

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

30 DEC. 2003

PAR L'INPI

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17
FRANCE

Vos références pour ce dossier

(facultatif) 240959 D21706 AD

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie**2** NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

☐

brevet européen Demande de brevet initiale

N°

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

OLIGONUCLEOTIDE ET SON UTILISATION POUR MODULER L'EXPRESSION DE LA PROTEIN-KINASE C
ISOFORME BETA-1 COMME AGENT DE DEPIGMENTATION CUTANEE

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»**5** DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)☒ Personne morale☐ Personne physique

Nom

ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile

ou

siège

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

L V M H RECHERCHE

GROUPEMENT D'INTERET ECONOMIQUE

322670928

20, avenue Hoche 75008 PARIS FRANCE

FRANCE

Française

N° de télécopie (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»Remplir impérativement la 2^{ème} page

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

30 DEC 2003

LIEU

75 INPI PARIS 34 SP

N° D'ENREGISTREMENT

0315560

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 030103

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

240959 D21706 AD

Cabinet REGIMBEAU

20, rue de Chazelles

75847 PARIS CEDEX 17

01 44 29 35 00

01 44 29 35 99

info@regimbeau.fr

7 INVENTEUR (S)Les demandeurs et les inventeurs
sont les mêmes personnes

Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques

☐ Oui☒ Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)**8 RAPPORT DE RECHERCHE**

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat
ou établissement différé☒
☐Paiement échelonné de la redevance
(en deux versements)

Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt

☐ Oui☐ Non**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)☐ Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la
décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG**10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES
ET/OU D'ACIDES AMINÉS**☒ Cochez la case si la description contient une liste de séquences

Le support électronique de données est joint

☒La déclaration de conformité de la liste de
séquences sur support papier avec le
support électronique de données est jointe☒Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes**11 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

M. ROCHE

La présente invention concerne des séquences oligonucléotidiques ainsi que leurs dérivés capables de s'hybrider avec le gène ou avec les produits du gène codant pour la Protein-Kinase C (PKC) isoforme beta-1(PKC-beta-1).

5 La présente invention concerne également l'utilisation de ces nouvelles séquences oligonucléotidiques comme agent dépigmentant ou blanchissant de la peau dans une composition cosmétique ou dans une composition dermatologique.

Chez l'homme, la pigmentation résulte de la synthèse et de la distribution des pigments mélaniques dans la peau, les follicules pileux ou les yeux. La pigmentation est génétiquement prédéfinie mais elle est régulée par de nombreux facteurs internes ou externes. Les mélanines produites par les mélanocytes ainsi que le nombre de mélanocytes, leur activité tyrosinase et leur capacité à exporter les mélanines vers les kératinocytes, la taille des mélanosomes qui contiennent des grains de mélanine, vont conditionner la couleur de la peau humaine. Pour chaque individu, la couleur de la peau varie principalement en fonction de l'irradiation plus ou moins importante des rayons ultra-violets (UV). Autrement dit pour chaque individu, il existe une pigmentation cutanée de base lorsqu'il subit la plus faible irradiation UV, correspondant à sa couleur de peau la plus claire, et une pigmentation cutanée plus intense s'il reçoit une irradiation UV plus forte, allant jusqu'à une pigmentation maximum correspondant à sa couleur de peau la plus foncée lorsqu'il est exposé de manière prolongée à une irradiation UV intense, telle que celle que l'on peut rencontrer en altitude en montagne.

D'autre part, comme on le sait bien, il existe dans la population mondiale, une très grande diversité génétique quant à la pigmentation cutanée. Ainsi, selon les populations, la couleur de la peau correspondant à la pigmentation de base définie ci-dessus, présente une teinte plus ou moins claire se situant entre les deux extrêmes : très claire et très foncée. Egalement selon les populations, la différence de teinte de la peau entre la pigmentation de base et la pigmentation maximum est plus ou moins importante. Ainsi, il est bien connu que les personnes appartenant à certaines populations à peau claire (pigmentation de base) réagissent rapidement et/ou de manière importante à l'action des UV et peuvent donc facilement présenter une peau de teinte foncée, même lorsque ces personnes ne se sont pas

exposées volontairement et de façon prolongée au soleil. Dans la suite du texte, ces personnes seront désignées par l'expression « personnes très réactives aux UV ». Il en est notamment ainsi de populations d'origine asiatique ou de certaines populations dites métisses.

5 Par ailleurs, des personnes voient apparaître sur leur peau, en particulier au niveau du visage ou des mains des zones et/ou des taches plus foncées et/ou plus colorées conférant à la peau une hétérogénéité. Ces taches sont dues à une concentration importante de mélanine dans les kératinocytes de l'épiderme.

Le mécanisme de formation de la pigmentation cutanée fait intervenir la
10 synthèse des mélanines. Ce mécanisme est particulièrement complexe et fait intervenir schématiquement les principales étapes suivantes :

Tyrosine \longrightarrow Dopa \longrightarrow Dopaoquinone \longrightarrow Dopachrome \longrightarrow Mélanines

La tyrosinase, activée par une réaction de phosphorylation catalysée par la Protein Kinase C, est une enzyme essentielle intervenant dans cette suite de
15 réactions. La tyrosinase catalyse notamment la réaction de transformation de la tyrosine en Dopa (Dihydroxyphénylalanine) et la réaction de transformation de la Dopa en Dopaoquinone conduisant à la formation des pigments mélaniques.

Une molécule est reconnue comme dépigmentante si elle agit directement sur les mélanocytes épidermiques en inhibant l'activité de ces cellules et/ou si elle
20 bloque l'une des étapes de la biosynthèse des mélanines. C'est le cas notamment lorsque la molécule inhibe l'une des enzymes impliquées dans la mélanogénèse ou lorsqu'elle réagit avec les composés chimiques de la chaîne de synthèse des mélanines.

Les substances dépigmentantes connues sont notamment l'hydroquinone et
25 ses dérivés, l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique, l'arbutine, les iminophénols (WO 99/22707), l'association de carnitine et de quinone (DE 19806947), les dérivés amides d'amino-phénol (FR 2 772 607), et les dérivés de benzothiazole (WO 99/24035). Ces substances peuvent présenter certains inconvénients. Elles peuvent être instables, nécessiter une utilisation à des
30 concentrations élevées, manquer de spécificité quant à leur mode d'action, ou présenter un pouvoir cytotoxique ou irritant.

L'utilisation topique de substances dépigmentantes efficaces et inoffensives est particulièrement recherchée en cosmétique et en dermatologie. On utilise notamment ces substances pour traiter des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmas idiopathiques, les
5 hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires dites de sénescence (lentigos séniles), les hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-lésionnelle, ainsi que certaines leucodermies telles que le vitiligo. Dans ces derniers cas, à défaut de pouvoir repigmenter la peau, on atténue
10 la pigmentation de la périphérie des zones dépigmentées pour donner à la peau une couleur plus homogène.

Des substances dépigmentantes sont également utilisées en tant qu'agents de blanchiment de la peau par certaines personnes, en particulier celles désignées plus haut, qui sont très réactives aux UV, pour éclaircir leur teint, notamment
15 celui de leur visage et de leurs mains, afin de conserver une couleur de peau la plus claire possible ou tout au moins de réduire les effets pigmentants des rayons UV.

Le problème posé aux professionnels est donc la conception, la fabrication ou l'isolement de nouvelles substances dépigmentantes ou de nouveaux agents
20 blanchissant de la peau humaine, des poils et/ou des cheveux ne présentant pas les inconvénients des substances connues, c'est-à-dire qui soient non irritants, non toxiques et/ou non allergisants pour la peau et stables dans une composition, et qu'ils présentent une activité à très faible concentration sans aucune cytotoxicité.

L'utilisation d'un oligonucléotide antisens pour traiter les maladies dues à
25 un dysfonctionnement des mélanocytes, en particulier le vitiligo et d'autres maladies dépigmentantes, a été décrite dans WO 99/25819. Dans ces pathologies cutanées, l'hypopigmentation résulte d'une teneur anormalement élevée en ténascine. Les oligonucléotides décrits dans ce document agissent contre l'hypopigmentation en régulant l'expression de la ténascine.

30 Au contraire, l'objet de la présente invention consiste à fournir un agent dépigmentant agissant sur le processus de la mélanogénèse, destiné d'une part, dans le cas d'une pigmentation sensiblement homogène, au blanchiment de la

peau, des poils ou des cheveux, c'est-à-dire à diminuer leur pigmentation, et d'autre part, à lutter contre l'hyperpigmentation cutanée à savoir lorsque la peau présente une hétérogénéité de pigmentation.

On connaît de part la demande de brevet WO 01/58918 des
5 oligonucléotides capables de s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase ou la tyrosinase related-protein 1, enzymes entrant dans le métabolisme de la mélanine. Les séquences décrites permettent de mettre au point des compositions agissant comme agent dépigmentant ou blanchissant de la peau, des poils ou cheveux.

10 Les inventeurs de la présente invention ont trouvé que, de manière surprenante, des séquences d'oligonucléotide, autres que celles pouvant s'hybrider de façon spécifique avec les enzymes spécifiquement impliquées dans le métabolisme de la mélanine, étaient utiles et efficaces pour agir en tant qu'agent dépigmentant ou blanchissant de la peau, des poils ou cheveux, et ce sans procurer
15 d'effet secondaire.

La présente invention a pour objet un oligonucléotide comportant un nombre de nucléotides compris entre 7 et 25, de préférence égal à 20, capable de s'hybrider de façon spécifique avec les gènes ou les produits des gènes codant pour la protéine kinase C beta-1 (PKC beta-1).

20 Les inventeurs de la présente invention ont trouvé que des oligonucléotides pouvant s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou les produits des gènes (tels que les ARN) codant pour la PKC isoforme beta-1 présentent une activité dépigmentante. Cette activité existe même à très faible concentration, ce qui augmente l'intérêt de ces oligonucléotides. De plus, ces oligonucléotides selon
25 l'invention ne présentent aucune cytotoxicité.

Les oligonucléotides selon l'invention interviennent en amont des mécanismes de la mélanogénèse en modulant l'expression de la PKC beta-1 et donc son activité. Par conséquent, la diminution de l'activité de la PKC beta-1 conduit à une diminution de la phosphorylation de la tyrosinase dans les
30 mélanocytes.

Les oligonucléotides selon l'invention offrent une solution idéale aux problèmes posés par les substances utilisées classiquement. Les substances

connues qui inhibent l'activité de la tyrosinase (notamment l'hydroquinone et ses dérivés, l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique, l'arbutine) présentent de multiples effets secondaires inacceptables du fait de leur faible spécificité.

5 La présente invention résout donc les problèmes rencontrés par les recherches antérieures en modulant l'activation de l'enzyme par phosphorylation au lieu d'inhiber directement l'enzyme après son activation pour obtenir l'effet dépigmentant.

Dans la présente invention, le terme "oligonucléotide" signifie des
10 polynucléotides formés à partir de nucléobases naturelles et de groupements penta-furanosyles (sucre) formant des nucléosides qui sont reliés entre eux par liaisons phosphodiester natives. Le terme "oligonucléotides" se réfère donc aux espèces naturelles ou aux espèces synthétiques formés à partir de sous unités naturelles ou de leurs homologues proches.

15 Le terme "oligonucléotides" désigne une structure comprenant des nucléotides, de préférence des désoxyribonucléotides, mais également des ribonucléotides. Le terme concerne seulement la structure primaire de la molécule. Ainsi, ce terme inclut l'ADN double et simple brin, aussi bien que l'ARN double et simple brin.

20 Le terme "oligonucléotides" peut se référer aussi aux parties qui ont des fonctions similaires aux oligonucléotides naturels mais qui peuvent présenter des portions non naturelles. Les oligonucléotides peuvent avoir des parties sucres, des parties nucléobases ou des liaisons internucléotidiques modifiées. Parmi les modifications possibles, les modifications préférées sont les dérivés 2'-O-alkyle
25 sur la partie sucre, en particulier les dérivés 2'-O-éthylloxyméthyle ou 2'-O-méthyle, et/ou les phosphorothioates ou les méthylphosphonates pour le squelette internucléotidique.

Les oligonucléotides chimériques sont compris dans les modifications préférentielles de l'invention. Les oligonucléotides contiennent au moins deux
30 régions chimiquement différentes, chacune comprenant au moins un nucléotide. Il s'agit en particulier d'une ou de plusieurs régions comprenant un nucléotide modifié qui confère une ou plusieurs propriétés bénéfiques comme par exemple

une meilleure stabilité biologique, une biodisponibilité accrue, l'augmentation de l'internalisation cellulaire ou l'augmentation de l'affinité pour l'ARN cible.

De façon préférée, le squelette internucléotidique peut être en tout ou partie phosphodiesters, ou phosphorothioates, ou méthylphosphonates ou les
5 combinaisons de liaisons phosphodiesters et/ou phosphorothioates et/ou méthylphosphonates.

Le terme "oligonucléotide" peut également se référer à des oligonucléotides auxquels on a greffé un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique ou un vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique
10 ou peptidique.

Dans la présente invention, on entend par :

- "capable de s'hybrider" ou "hybridation", la formation de liaisons hydrogènes, aussi connue comme appariement Watson-Crick entre les bases complémentaires, usuellement sur deux brins d'acide nucléique pour former un
15 duplex en double hélice, ou triplex si l'oligonucléotide est constitué d'un double brin.

Le degré de complémentarité entre deux séquences d'acide nucléique de longueur identique est déterminé en comparant, après alignement, la première séquence avec la séquence complémentaire de la seconde séquence. Le degré de
20 complémentarité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide est identique entre les deux séquences ainsi comparées, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le degré de complémentarité entre ces deux séquences.

25 - "gène codant pour la PKC", la séquence génomique de la PKC comprenant les introns et exons de ce gène.

- "PKC beta-1", l'isoforme beta-1 de la PKC

- "produit des gènes codant pour la PKC", les séquences ARN messagers.

L'oligonucléotide selon l'invention s'hybride de préférence spécifiquement
30 avec le gène ou les produits du gène codant pour la PKC isoforme beta-1. En particulier, l'oligonucléotide de l'invention est capable de s'hybrider avec l'ADN du gène qui code pour la PKC et/ou avec l'ARNm dérivant de ces gènes. Les

oligonucléotides selon l'invention comportent un nombre de nucléotides suffisant en identité et en nombre pour s'hybrider de façon spécifique. Cette propriété est couramment appelée "antisens".

5 Dans la présente invention, le terme "hybridation spécifique" signifie en particulier qu'il existe un degré de complémentarité suffisant pour éviter la fixation non spécifique de l'oligonucléotide sur une séquence non ciblée dans les conditions où la fixation spécifique est souhaitée. Il est entendu que l'oligonucléotide n'a pas besoin de présenter une complémentarité de 100% avec la séquence de l'acide nucléique cible pour s'hybrider spécifiquement. En 10 particulier, un oligonucléotide présentant un degré de complémentarité au moins égal à 80 % environ est capable de s'hybrider spécifiquement avec l'acide nucléique choisi comme cible.

Le rôle d'activateur de la tyrosinase par phosphorylation joué par la PKC et le rôle clé de la tyrosinase dans la mélanogénèse sont connus. L'utilisation d'un 15 oligonucléotide dirigé contre un ARN messager codant pour une enzyme ou une protéine et même la PKC beta-1 afin d'en moduler l'expression est également connue.

Cependant, le rôle de l'isoforme beta-1 de la Protein Kinase C n'était pas connu spécifiquement dans la mélanogénèse. Le caractère ubiquitaire de la PKC 20 fait que la non spécificité d'action des inhibiteurs classiques est rédhibitoire pour un usage dermatologique ou pharmaceutique. De plus, les inhibiteurs classiques de la PKC bêta couvrent les isoformes beta-1 et beta-2 et ne sont donc pas spécifiques des mélanocytes puisque des cellules comme les cellules de Langerhans présentes dans la peau ont une activité PKC beta-2.

25 La technique élaborée par les inventeurs de la présente invention est la seule qui permette d'avoir une action spécifique sur l'isoforme bêta-1 en préservant les autres isoformes de la PKC bêta et de la PKC en général. De plus cette technique n'avait jamais été utilisée comme moyen de dépigmentation.

L'oligonucléotide selon l'invention est déterminé pour s'hybrider 30 directement à l'ARN messager ou au gène. Ils permettent ainsi de réaliser une modulation ultime de la quantité de PKC bêta-1 produite par les gènes.

Dans un mode de réalisation préférentiel, l'oligonucléotide selon l'invention est capable de s'hybrider de façon spécifique avec une quelconque des régions 5' à 3', codante ou non codante des gènes codant pour la PKC bêta-1.

Dans un mode de réalisation plus préférentiel, la séquence de l'oligonucléotide est l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5 ayant la signification suivante :

- SEQ ID N°1 : ACACCCCAGGCTCAACGATG
- SED ID N°2 : TGG AGT TTG CAT TCA CCT AC
- SEQ ID N°3 : AAA GGC CTC TAA GAC AAG CT
- 10 - SED ID N°4 : GCC AGC ATC TGC ACC GTG AA
- SED ID N°5 : CCG AAG CTT ACT CAC AAT TT

Dans un mode de réalisation encore plus préférentiel, la séquence est l'une des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°4, et plus particulièrement la séquence SEQ ID N°1.

15 Dans un autre mode de réalisation préférentiel selon l'invention, l'oligonucléotide comprend une ou plusieurs modifications chimiques au niveau de ses parties sucres, ses parties nucléobases ou son squelette internucléotidique qui confèrent des caractéristiques physico-chimiques améliorées audit oligonucléotide.

20 Par "caractéristiques physico-chimiques améliorées", on entend des caractéristiques souhaitables de l'oligonucléotide selon l'invention, telles qu'une biodisponibilité accrue, l'augmentation de l'affinité pour les séquences cibles, l'augmentation de l'internalisation cellulaire ou une meilleure stabilité biologique ou l'augmentation de la stabilité en présence de nucléases cellulaires.

25 A titre d'exemple, les modifications pouvant conférer ces caractéristiques sont les dérivés 2'-O-alkyle et 2'-O-fluoro sur la partie sucre du nucléoside, et les dérivés phosphorothioates ou les dérivés méthylphosphonates au niveau du squelette internucléotidique.

Dans un mode de réalisation préférentiel selon l'invention, 30 l'oligonucléotide est modifié chimiquement en ce que :

- une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements phosphorothioates.

- une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements méthylphosphonates.

- tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements phosphorothioates.

5 - tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements méthylphosphonates.

- les groupements phosphodiesters sont remplacés en tout ou partie par des groupements phosphorothioates et/ou par des groupements méthylphosphonates.

10 - on a greffé sur l'oligonucléotide un vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique ou peptidique, ou un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique.

La présente invention a aussi pour objet une composition cosmétique contenant l'oligonucléotide décrit précédemment et un milieu cosmétiquement acceptable.

15 Une telle composition peut contenir en outre, un ou plusieurs agents actifs visant à renforcer les effets recherchés.

Lesdits agents actifs utilisables en association avec l'oligonucléotide selon l'invention, utilisés purs ou provenant d'extraits renfermant ces molécules, sont notamment les composés suivants: un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase, un oligonucléotide antisens dirigé
20 contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1), l'acide ellagique et ses dérivés ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothénate sulfonate et ses dérivés ; des molécules interférant directement ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte stimulating hormone (α -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; les polyols
25 tels que la glycérine le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique, seuls ou greffés ; l'acide ascorbique et ses dérivés ; les rétinoïdes et les caroténoides en préparation
30 liposomique ou non tels que le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acétate, le bêta-carotène, des agents antiglycation et/ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses

dérivés, l'ergothionéine, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, la thiamine pyrophosphate, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate; les agents apaisants et leurs
5 mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc; et les acides désoxyribonucléiques et/ou nucléiques.

En cas d'incompatibilité, ces actifs et/ou les oligonucléotides peuvent être incorporés dans des sphérules, notamment des vésicules formés de lipides
10 amphiphiles ioniques ou non ioniques telles que décrites dans le brevet français FR 2534487 et/ou des nanoparticules et/ou des nanosphères.

La composition cosmétique selon l'invention est appropriée pour une utilisation topique et contient donc un milieu cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau.

15 La séquence oligonucléotide selon l'invention peut être présente de manière préférentielle en quantité allant de 0,00001% à 10% et de préférence de 0,0003% à 3% du poids total de la composition cosmétique.

La composition de l'invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées pour une application topique notamment sous
20 forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile ou multiple, d'un gel aqueux ou huileux, d'un produit anhydre liquide, pâteux ou solide, d'une dispersion d'huile dans une phase polymérique telle que les nanosphères et les nanocapsules ou mieux des vésicules lipidiques de type ionique et/ou non-ionique tels que décrit dans le brevet français
25 FR 2534487.

Cette composition peut être plus ou moins fluide et avoir l'aspect d'une crème blanche ou colorée, d'une pommade, d'un lait, d'une lotion, d'un sérum, d'une pâte ou d'une mousse. Elle peut éventuellement être appliquée sur la peau sous forme d'aérosol. Elle peut également se présenter sous forme solide
30 pulvérulent ou non, par exemple sous forme stick. Elle peut encore se présenter sous la forme de patchs, de crayons, de pinceaux et d'applicateurs autorisant une

application localisée sur les taches du visage ou des mains. Elle peut être utilisée comme produit de soin et/ou comme produit de maquillage.

De façon connue, la composition de l'invention peut contenir également les adjuvants habituels dans les domaines cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les actifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les pigments, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse, dans les vésicules lipidiques et/ou dans les nanoparticules.

Dans un mode de réalisation préférentiel selon l'invention, la composition cosmétologique se présente sous la forme d'une émulsion contenant une huile, un émulsionnant choisi parmi les esters d'acide gras et de polyéthylène glycol, tels que le stéarate de PEG-20, et les esters d'acide gras et de glycérine, tels que le stéarate de glycérine, et un co-émulsionnant.

Lorsque la composition cosmétique de l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5 à 80% en poids, et de préférence de 5 à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les émulsionnants et les co-émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3% à 30% en poids, et de préférence de 0,5% à 20% en poids par rapport au poids total de la composition.

Comme huiles utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles d'origine végétale (huile d'avocat, huile de soja), les huiles d'origine animale (lanoline), les huiles de synthèse (perhydrosqualène), les huiles siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers). On peut aussi utiliser comme matière grasses des alcools gras (alcool cétylique), des acides gras, des cires (cire de Carnauba, ozokérite).

Comme émulsionnants et coémulsionnants utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer par exemple les esters d'acide

gras et de polyéthylène glycol tels que le stéarate de PEG-20 et les esters d'acide gras et de glycérine tels que le stéarate de glycéryle.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer en particulier les polymères
5 carboxyvinyliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides, les gommes naturelles et les argiles. Comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras, la silice hydrophobe et les polyéthylènes.

10 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une séquence oligonucléotide dirigée contre les produits de transcription des gènes codant pour la PKC beta-1 pour la fabrication d'une composition cosmétique.

Cette composition cosmétique est utile pour dépigmenter et/ou blanchir la peau, les poils et/ou les cheveux humains.

15 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un oligonucléotide à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition pharmaceutique topique destinée au traitement ou à la prévention des hyperpigmentations régionales par hyper-activité
20 mélanocytaire telles que les mélasmas idiopathiques, des hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires séniles (lentigo actiniques), des hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-lésionnelle, et pour le traitement de certaines leucodermies telles que le vitiligo.

Dans un mode de réalisation préférentiel selon l'invention, l'utilisation est
25 caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de ladite composition pharmaceutique topique

La composition pharmaceutique est destinée à être administrée de façon
simultanée, séparée ou étalée dans le temps en association avec un ou plusieurs
30 actifs.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans toutefois la limiter.

Pour des raisons de stabilité dans les milieux de culture in-vitro et conformément à l'usage, les exemples 2 à 4 ont été réalisés avec des dérivés phosphorothioates et les exemples 5 à 12 ont été réalisés indifféremment avec des dérivés phosphorothioates ou phosphodiester.

Dans les exemples qui suivent, tous les pourcentages sont donnés en poids, sauf indications contraires.

10 Exemple 1 : Synthèse des Oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés avec un synthétiseur automatique (Perseptive Biosystems Expedite modèle 8909) en utilisant la chimie standard des dérivés phosphoramidites en utilisant les protocoles du constructeur. Les β -cyanoéthyl-diisopropylphosphoramidites ont été fournis par la société Perseptive Biosystems. Pour les oligonucléotides phosphodiester, l'étape d'oxydation du phosphite a été effectuée avec une solution d'iode. En ce qui concerne les oligonucléotides phosphorothioates, l'étape d'oxydation du phosphite a été effectuée en utilisant une solution 0,05 M de 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide dans de l'acétonitrile anhydre. Après clivage de la colonne (Controlled Pore Glass, Perseptive Biosystems) et déprotection totale de la séquence par un traitement de 18h à 55°C par une solution d'ammoniaque à 33%, les oligonucléotides ont été purifiés par précipitation dans l'éthanol en présence d'acétate de sodium. Des contrôles par chromatographie liquide haute pression ont été ensuite réalisés par chromatographie échangeuses d'ions avec élution par un gradient de chlorure de sodium et par chromatographie en phase inverse C18 avec élution par un gradient d'acétonitrile en présence d'acétate de triéthylammonium.

A titre d'exemple, les oligonucléotides suivants ont été synthétisés. Ils sont décrits dans le tableau 1. Il s'agit de cinq séquences de ce tableau, numérotées SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 et SEQ ID N°5. Leur activité dépigmentante a fait l'objet d'études rapportées dans les exemples suivants, et plus spécifiquement pour la séquence SEQ ID NO.1.

Dans le tableau 1, les numéros mentionnés sous chaque extrémité des séquences indiquent la position de l'oligonucléotide dans les séquences d'origine.

La séquence provient de la séquence dite « HSPB1A » de l'ARN messager codant pour la protéine kinase C type bêta 1 (Genbank accession number
5 X06318).

Par ailleurs, à titre comparatif, et pour confirmer la spécificité des oligonucléotides selon l'invention vis à vis des gènes ou des produits de gènes codant pour la PKC bêta 1, un oligonucléotide basé sur la séquence SEQ ID N°1 de l'invention, a été synthétisé, à savoir, une séquence dite « contrôle sens »,
10 désignée SEQ ID N°6 dans le tableau 1, consistant à inverser l'ordre des bases de la séquence SEQ ID N°1.

TABLEAU 1

SEQ ID NO.	SEQUENCE OLIGONUCLEOTIDE	LOCUS
1.	ACA CCC CAG GCT CAACGA TG 2186 2167	HSPKCB1A
2.	TGG AGT TTG CAT TCA CCT AC 2168 2149	HSPKCB1A
3.	AAA GGC CTC TAA GAC AAG CT 2285 2266	HSPKCB1A
4.	GCC AGC ATC TGC ACC GTG AA 2250 2231	HSPKCB1A
5.	CCG AAG CTT ACT CAC AAT TT 2569 2550	HSPKCB1A
6.	GTA GCA ACT CGG ACC CCA CA 2167 2186	HSPKCB1A

15 **Exemple 2 : Activité anti-PKC bêta 1 de la séquence SEQ ID N°1 sur mélanocytes par western-blot**

Les mélanocytes M4Beu sont des cellules isolées de mélanome humain. (R Jacubovich et J.F. Dore Cancer Immunol. Immunother., 7 (1979), 59-64.).

Le milieu de culture utilisé pour ces cellules est le milieu Dubelco's Modified Eagle supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, GB) et de gentamicine à une concentration de 4µg/ml.

Les cellules M4Beu sontensemencées à 500 000 cellules par boîte avec la
5 SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 à 1µM dans le milieu et pendant 3 jours le milieu est changé une fois avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 jusqu'à confluence des cellules, les cellules étant récupérées 24 heures après le dernier traitement.

Lorsque les cellules sont confluentes, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite collectées par
10 grattage dans 200µl de tampon de lyse complet. La suspension est congelée à -80°C. Le lysat cellulaire est obtenu par sonication à une amplitude de 7µm pendant 2x10s.

Les protéines du lysat cellulaire sont dosées selon la méthode colorimétrique de Bradford en utilisant la micro méthode du kit Biorad
15 (Référence: Bio-Rad protein assay 500-0002, Hercules CA, USA).

L'électrophorèse des protéines est réalisée en minigel de polyacrylamide de 1mm d'épaisseur à 7,5 % en conditions dénaturantes et réductrices, en tampon discontinu selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels à 7,5% T, 2,7% C permettent de séparer les protéines d'une masse moléculaire de 30 à 200kDa, ce
20 qui nous permet d'avoir la migration de la PKCβ au milieu du gel.

15 µg de protéine du lysat cellulaire sont déposés, complété avec du tampon de lyse à 15 ou 20µl pour déposer un volume fixe. 4 ou 5 µl respectivement de bleu de migration 4x sont ajoutés aux lysats qui sont ensuite chauffés à 95 % pendant 5mn pour dénaturer les protéines.

25 L'électrophorèse est réalisée sous réfrigération et à ampérage constant et voltage non limitant.

Après l'électrophorèse, le gel est lavé dans le tampon de transfert, pour une renaturation des protéines. Une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride,) de bonne tenue mécanique et de forte capacité de fixation des protéines, est
30 également équilibrée dans ce même tampon de transfert.

Le transfert est réalisé par électroélution des protéines hors du gel sur la membrane de PVDF. L'appareil, le Trans-blot SD (semi-dry cell), transfère dans

une configuration horizontale. Afin de neutraliser les sites aspécifiques, la membrane est placée dans du lait en poudre demi-écrémé (Régilait®) dissout dans du tampon TBS-T.

Les membranes sont lavées puis incubées avec l'anticorps primaire, c'est-à-dire anti PKC bêta I ou bêta II, sous agitation pendant une heure à température ambiante.

L'anticorps primaire est un anticorps polyclonal de lapin anti PKC bêta I ou bêta II humaine. Il est utilisé à 0,02µg/ml (Santacruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Afin d'éliminer l'excès d'anticorps primaire les membranes sont rincées avec le TBS-T, puis incubées pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire. L'anticorps secondaire est un anti-lapin fait chez le singe couplé à la peroxydase de raifort (Amersham, Buckinghamshire, GB). L'excès d'anticorps est éliminé par rinçages successifs dans le TBS-T.

La détection des protéines se fait par chimioluminescence, utilisant le luminol comme substrat de la peroxydase (kit ECL, Amersham, Buckinghamshire, GB). Après incubation de la membrane avec le luminol et un amplificateur, la membrane est recouverte d'un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, GB). Le temps d'exposition du film sur la membrane est de 30 minutes. Les taches obtenues sont quantifiées grâce au logiciel "Biolise 3,02V" (BMG LABTECH GmbH, Hanns-Martin-Schleyer-Str. 10, D-77656 Offenburg/Germany). Ce logiciel permet de calculer le volume des taches.

A partir de ces volumes, un pourcentage d'inhibition peut être calculé par rapport à un témoin d'expérience de la manière suivante: $[1 - (\text{Vol. de l'échantillon} / \text{Vol du témoin})] \times 100$. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2 ci-après.

TABLEAU 2

	Pourcentage d'inhibition de la PKC- bêta 1
témoin	0
SEQ ID N°6	5
SEQ ID N°1	100

Exemple 3 : Activité anti-PKC beta-1 de la séquence SEQ ID N°1 sur mélanocytes par RT-PCR.

Les mélanocytes M4Beu sont des cellules isolées de mélanome humain. (R
5 Jacobovich et J.F. Dore Cancer Immunol. Immunother., 7 (1979), 59-64.).

Le milieu de culture utilisé pour ces cellules est le milieu Dubelco's Modified Eagle supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, GB) et de gentamicine à une concentration de 4µg/ml.

Les cellules M4Beu sont ensemencées à 500 000 cellules par boîte avec la
10 SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 à 1µM dans le milieu et pendant 3 jours le milieu est changé une fois avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 jusqu'à confluence des cellules, les cellules étant récupérées 24 heures après le dernier traitement.

Ensuite, le milieu de culture est éliminé. Le tapis cellulaire est rincé avec
du PBS. Les cellules sont incubées 1mn avec une solution de trypsine-EDTA la
15 réaction est stoppée par addition de milieu supplémenté avec du SVF à 10%. La suspension cellulaire obtenue est transférée dans un tube de 15ml et centrifugée pour obtenir le culot cellulaire. Ce culot est ensuite rincé deux fois avec du PBS. Il peut être congelé à sec à -80°C.

C'est à partir de ces culots que l'ARN total sera isolé. Après avoir vérifier
20 que le β-mercaptoéthanol a été ajouté au tampon de lyse SV ARN, 175µl de ce tampon est ajouté au culot cellulaire. La dilution des extraits cellulaires dans une solution de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) contenant une grande concentration en guanidine thiocyanate (tampon de lyse SV ARN) permet de détruire les complexes nucléoprotéiques associés aux ARN et donne ainsi une précipitation
25 sélective des protéines cellulaires, alors que l'ARN reste en solution. Après centrifugation pour nettoyer le lysat des protéines précipitées et des débris cellulaire, l'ARN va être purifié à partir de ce culot. La solution claire du lysat est ainsi récupérée dans un tube propre.

L'ARN est sélectivement précipité par une solution d'éthanol. Cette
30 précipitation est transférée sur la colonne où l'ARN va se lier aux fibres de verre. Après lavage de la colonne avec la solution de lavage SV ARN, les ARN restent fixés sur la colonne.

La Rnase-free Dnase I est appliquée directement sur la colonne pour digérer les ADN génomiques contaminants. La DNase est agitée pendant 15mn, la réaction est stoppée par addition de 200µl de solution Stop SV Dnase sur la colonne.

5 Puis après lavage avec la solution de lavage SV ARN, les ARN totaux sont finalement élués de la colonne par addition de 100µl d'eau nuclease-free.

Les ARN sont dosés à 260nm. Une unité de densité optique correspond à 40µg /ml d'ARN. Le rapport de l'absorbance à 260nm et à 280nm (DO 260/DO 280) fournit des indications quant à la pureté de l'ARN préparé et doit se situer
10 entre 1,8 et 2 la présence de protéines pouvant diminuer ce rapport.

La concentration (µg/ml) = DO à 260 nm x 40 x facteur de dilution de lecture

La non dégradation de ARNs est vérifiée par électrophorèse d'un aliquot de 2µg en minigel d'agarose à 0,8%. Les ARN sont visualisés grâce au BET.

15 Le gel est préparé en dissolvant 0,4g d'agarose dans 50ml de tampon tris borate, TBE 1x, par chauffage. Au moment de couler le gel 2,5µl de BET à 10mg/ml sont ajoutés.

La migration s'effectue à 80V pendant 30mn.

Les ARN 18s, 28s et 4s sont colorés au BET et visualisés sous UV (Table
20 Bioblock Scientific, Illkirch, France, longueur d'onde 312nm).

Des échantillons non dégradés laissent apparaître 2 bandes intenses d'ARN 28s et 18s, ainsi qu'une bande moins intense d'ARN 4S.

Pour chaque ARN extrait, deux tubes sont préparés: 1 tube où l'enzyme (Transcription inverse (RT) M-MLV, Gibco, Paisley, GB) sera ajoutée RT+, et 1
25 où l'enzyme ne sera pas ajoutée RT-. A partir d'un simple brin d'ARN et en présence d'amorces l'enzyme est capable de synthétiser un brin complémentaire.

Les résultats sont présentés dans la Tableau 3.

TABLEAU 3

	RT+	RT-
pdN(6) 6U/ml 0,3U ds l'essai	1 μ l	1 μ l
ARN total 2 μ g/ μ l ds l'essai	2 μ g/ μ l	2 μ g/ μ l
H2O	qsp 11,5 μ l	qsp 11,5 μ l

Dans le tableau 3, pdN(6) sont des oligonucléotides composés de 6 nucléotides au hasard, ils serviront d'amorce pour la transcriptase inverse.

5 Pour dénaturer les ARN, ces tubes sont mis à 65°C pendant 5mn.

Pendant ce temps, le mélange ou mix ci-dessous présenté dans le Tableau 4 est préparé pour chaque tube RT+ et RT-.

TABLEAU 4

MIX	x1 tube
Tampon RT 5x 1x dans l'essai	4 μ l
dNTP (10mM) dans l'essai 500 μ M	1 μ l
dTT (0,1M) dans l'essai 10mM	2 μ l
RNA guard	0,5 μ l
TOTAL	7,5 μ l

10

Dans chaque tube RT+ et RT-, 7,5 μ l de mix sont ajoutés.

Puis 1 μ l d'enzyme RT (200U dans l'essai) est ajoutée dans les tubes RT+, alors que dans les tubes RT-, on ajoute 1 μ l d'eau. Puis tous les tubes sont incubés pendant 1 heure à 42°C, température optimum pour que l'enzyme soit la plus efficace. Puis la réaction est stoppée en incubant les tubes à 95°C pendant 5mn.

15

Ainsi dans les tubes RT+ il y a de l'ADN, la RT ayant synthétisée le brin complémentaire de tous les ARN. Par contre dans les RT- il n'y a pas d'ADN, car il n'y a pas eu d'enzyme. Les tubes RT- servent de contrôle dans la réaction de PCR, pour savoir s'il y a contamination par l'ADN génomique.

5 Pour chaque tube RT+ et RT-, on réalise une PCR, c'est à dire une amplification enzymatique d'ADN.

2 couples de primer servent d'amorce à l'enzyme (Eurobio) ADN polymerase, Eurobio): couple 1 = primer PKC β /Act1, couple 2 = primer PKC β /Act2. Dans le même tube, il y aura donc amplification de la PKC β ou β I et
10 de l'actine. L'actine servant ici de témoin interne.

Pour chaque ADN provenant de la réaction de transcriptase inverse (RT+) ou non (RT-) les solutions suivantes sont préparées:

ADN de la RT 100ng dans l'essai	MgCl ₂ (50mM) 2mM dans l'essai	H ₂ O	Total
1 μ l	2 μ l	12 μ l	15 μ l

15 Le mélange suivant présenté dans la Tableau 5 est préparé pour tous les tubes.

Le volume final de réaction est de 50 μ l.

La réaction se fait dans un appareil de PCR (Crocodile II, Appligène, Illkirch, France)

Les conditions de réaction sont pour le couple 1:

20 1 cycle de dénaturation des ADN (ouverture des 2 brins) : 5 minutes à 95°C

40 cycles d'amplification des ADN: 30 secondes à 95°C (ouverture des brins)

30 secondes à 56°C (fixation spécifique des amorces)

25

30 secondes à 72°C (élongation des nouveaux brins)

1 cycle d'élongation des ADN nouvellement formés : 7 minutes à 72°C

TABLEAU 5

Mix PCR	x1 tube
Tampon PCR 10x dans l'essai 1x	5 μ l
dNTP (10mM) dans l'essai 500mM	1 μ l
Primer actine sens (5 μ M) dans l'essai 0,05 μ M	0,5 μ l
Primer actine antisens (5 μ M) dans l'essai 0,05 μ M	0,5 μ l
Primer PKC β ou PKC β I sens (5 μ M) dans l'essai 1 μ M	1 μ l
Primer PKC β ou PKC β I antisens (5 μ M) dans l'essai 1 μ M	1 μ l
H ₂ O	25,8 μ l
Taq	0,2 μ l
Total	35 μ l

Les conditions de réaction sont pour le couple 2 : Ce sont les mêmes
5 cycles de réaction mais la température de fixation spécifique des amorces est de 50°C.

Quantification de l'expression des ARN PKC β ou β I par rapport à l'expression de l'actine.

Les fragments d'ADN sont déposés sur un gel d'agarose à 2% coloré au
10 BET. La migration électrophorétique se fait à 80V pendant 45mn. Les bandes correspondant aux ARN sont visualisées sous UV (Table UV 312nm, Bioblock scientifique, Illkirch, France). 2 bandes apparaissent avec les ADN des tubes RT+ et aucune dans les RT-. Une échelle de poids moléculaires est déposée en même temps pour connaître la taille des bandes obtenues.

Pour le couple 1 le fragment correspondant à l'ARN de la PKC β I est de 547pb alors que le fragment de l'ARN correspondant à l'actine est de 308pb.

Pour le couple 2: le fragment correspondant à l'ARN de la PKC β est de 380pb alors que le fragment de l'ARN correspondant à l'actine est de 514pb.

5 Les bandes obtenues sont quantifiées grâce au logiciel "Biolise 3,02V". Ce logiciel permet de calculer le volume des bandes.

Nous comparons le rapport du volume des bandes de PKC β /actine ou PKC β I/actine.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

10

TABLEAU 6

	Pourcentage d'expression de l'ARNm codant pour la PKC-bêta 1
SEQ ID N°6	0
SEQ ID N°1	55

11

Exemple 4 : Activité anti-tyrosinase de la SEQ ID N°1 sur mélanocytes.

15 Les mélanocytes M4Beu sont des cellules isolées de mélanome humain. (R. Jacubovich et J.F. Dore Cancer Immunol. Immunother., 7 (1979), 59-64.).

Le milieu de culture utilisé pour ces cellules est le Dubelco's Modified Eagle Medium supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Paisley, GB) et de gentamicine à une concentration de 4 μ g/ml.

20 Les cellules M4Beu sontensemencées à 100 000 cellules par boîte avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 à 1 μ M dans le milieu et pendant 3 jours le milieu est changé une fois avec la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID n°6 jusqu'à confluence des cellules, les cellules étant récupérées 24 heures après le dernier traitement.

25 Après 3 lavages des boîtes au sérum physiologique ; avec racloire en plastique, les cellules sont récupérées dans 10 μ l de tampon (0,0625 M Tris HCl pH6, SDS 3%, Glycérol 10%). Une l'électrophorèse (Ready gel Tris-glycine 7,5% (Biorad, Hercules, CA, USA, ref 161-09000) tampon de migration Tris-glycine SDS buffer 1X (Biorad, Hercules, CA, USA, ref : 161-0732) est réalisée avec un dépôt du lysat cellulaire à la quantité de 30 μ g de protéine par puits .

Après migration à 15 mA, le gel est démoulé et rincé 3 fois 20 minutes dans du PBS sous agitation légère pour ramener le pH à 7,5 (pH optimal pour l'activité de la tyrosinase)

La révélation de l'activité tyrosinase est obtenue par incubation du gel 3 heures à 37 °C dans 10 ml d'une solution (1 g/l PBS de MBTH Sigma M8006, 1 g/l de PBS de DOPA Sigma D9628). le gel est rincé 3 fois au PBS pour arrêter la réaction de la tyrosine sur son substrat. Après photographie, la quantification est ensuite réalisée avec le logiciel "Biolise 3,02V".

Les résultats sont présentés dans la Tableau 7.

10

TABLEAU 7

	Pourcentage d'inhibition de l'activité de la tyrosinase
SEQ ID N°6	0
SEQ ID N°1	55

Exemple 5 : Poudre pour l'éclaircissement du teint du visage

Une poudre dont la composition est présentée dans le Tableau 8 a été préparée.

15

TABLEAU 8

Microcellulose	20,00%
Sodium lauryl sulfoacetate	15,00%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	1,00%
Parfum, colorants, conservateurs	qs.
Talc	Qsp. 100%

Cette poudre présente une double action. Elle permet un nettoyage de la peau, et de plus elle permet, par un usage régulier durant quelques jours, d'éclaircir le teint. On peut l'appliquer sur la peau du visage une à deux fois par jour.

20

Exemple 6 : Emulsion-gel visage de jour dépigmentante

Une émulsion-gel dont la composition est présentée dans le Tableau 8 a été préparée.

5

TABLEAU 9

Glycérine	5,00%
triglycérides caprylique/caprique/succinique	5,00%
Méthoxycinnamate d'octyle	1,00%
Diméthicone copolyol	0,50%
Acrylates / C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,50%
Oligonucléotide SEQ ID NO.4	0,01%
Neutralisant	qs.
Conservateurs, parfum, colorants	qs.
Eau	qsp. 100%

Certaines personnes soumises au rayonnement plus ou moins intense de la lumière du jour, voire du soleil directement, souhaitent conserver un teint clair et éviter l'apparition de taches pigmentées.

10

L'utilisation de l'émulsion-gel ci-dessus permettra d'atteindre ce but. Cette composition s'applique sur le visage généralement le matin. Elle agit aussi bien de manière préventive que curative sur la pigmentation, régulière ou non, du visage.

Exemple 7 : Fluide protecteur SPF 30 préventif des taches pigmentaires

15

Un fluide protecteur dont la composition est présentée dans le Tableau 10 a été préparé.

20

Le fluide protecteur est utilisé pour prévenir l'apparition de taches pigmentaires, chez les personnes prédisposées à ce phénomène, avant l'exposition à un rayonnement solaire intense. Il est à noter que la présence d'une concentration élevée en filtre solaire permet de compenser la diminution de la protection naturelle, conséquence de la baisse du taux de mélanine.

TABLEAU 10

Pentacyclométhicone volatile	49,00%
Dioxyde de titane	15,00%
Méthoxycinnamate d'octyle	7,50%
Glycérine	5,00%
Phényltriméthicone	5,00%
Diméthicone copolyol	3,00%
Polyméthylméthacrylate	2,50%
Butyl méthoxydibenzoyle méthane	1,00%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0, 1%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs, antioxydants	qs.
Eau	qsp. 100%

Exemple 8 : Crème visage dépigmentante

5

Une crème dont la composition est présentée dans le Tableau 11 a été préparée.

10 L'utilisation de cette crème permet de traiter les irrégularités de la pigmentation cutanée, en atténuant ou supprimant les taches de sénescence ou les taches pigmentaires actiniques. Elle homogénéise la coloration de la peau et éclaircit le teint.

15

20

TABLEAU 11

Glycéryl stéarate + Peg-100 stéarate	5,00%
Polyisobutène hydrogéné	4,00%
Magnésium ascorbyl phosphate	3,30%
Tricaprylate /caprate de glycérol	3,00%
Squalane	3,00%
Glycérine	2,00%
Cire d'abeille	1,50%
Cétéaryl octanoate	1,50%
Alcool cétylique	1,00%
Alcool stéarylique	1,00%
Diméthicone	1,00%
Gomme xanthane	0,30%
Acide éthylène diamine tétracétique	0,20%
Acide citrique	0,10%
Citrate de sodium	0,10%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0,10%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs	qs.
Eau	qsp. 100%

5 **Exemple 9 : Lotion visage pour éclaircir le teint**

Une lotion dont la composition est présentée dans le Tableau 12 a été préparée.

TABLEAU 12

Alcool éthylique	30,00%
PPG-3 Myristyl éther	5,00%
Glycérine	2,00%
Carbomer	0,20%
Polysorbate 20	0,20%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0,01%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs	qs.
Eau	qsp. 100%

Cette lotion pour éclaircir le teint s'utilise après le démaquillage et le nettoyage de la peau.

5 **Exemple 10 : Sérum Visage éclaircissant**

Un sérum dont la composition est présentée dans le Tableau 13 a été préparé.

TABLEAU 13

Eau	qsp 100%
Glycerine	2%
EDTA tetrasodique	qsp pH souhaité
Acide citrique	
Citrate trisodique	
Gomme xanthane	0.25%
Polyacrylamide, C13.14 isoparaffin, laureth-7	0.5%
Diméthicone copolyol	0.25%
Oligonucléotide SEQ ID n° 1	0.1%
Parfum, colorant, conservateur	qs

10 Une goutte de cette composition très concentrée de sérum, s'applique sur le visage généralement avant l'application d'une crème pour le visage. Ce sérum

s'utilise habituellement par cures d'une à deux semaines pour obtenir ou entretenir un éclaircissement du teint.

Exemple 11 : Lotion capillaire pour éclaircir la chevelure

- 5 Une lotion capillaire dont la composition est présentée dans le Tableau 14 a été préparée.

TABLEAU 14

Eau	qsp 100%
Alcool	50%
Panthenylethyl ether	0.5%
Acétate DL- α -tocophérol	0.2%
Polysorbate 60	1%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	0.01%
Parfum	0.2%
Glycerine	0.5%
Colorant	qs

- 10 Cette lotion s'applique sur les cheveux matin et soir pendant la durée nécessaire pour obtenir un éclaircissement progressif de la chevelure. Cette durée est généralement de plusieurs semaines.

Exemple 12 : Gel crème anti-taches pour les mains

- 15 Un gel-crème dont la composition est présentée dans le Tableau 15 a été préparé.

Ce gel-crème doit être appliqué directement sur les taches de sénescence (lentigos séniles) des mains, pour en atténuer la coloration.

TABLEAU 15

Caprylic/capric diglyceryl succinate	6%
Octyl octanoate	2.5%
Methoxycinnamate d'octyle	6%
Oligonucléotide SEQ ID NO. 1 (phosphodiester)	0.001%
Phenyltriméticone	2.5%
Benzophenon-3	0.5%
Hyaluronate de sodium	0.05%
Gomme xanthane	0.2%
Acrylates/C10.30 alkyl acrylate copolymer	0.5%
Glycerine	2%
PEG 150	3%
Neutralisants, Colorants, parfum, conservateurs	qs
Eau purifiée	qsp 100%

Exemple 13 : Solution dermatologique pour traiter l'hyperpigmentation d'origine pathologique.

5

Un sérum dont la composition est présentée dans le tableau 16 a été préparé.

10

15

TABLEAU 16

Pentacyclométhicone volatile	49,00%
Dioxyde de titane	15,00%
Méthoxycinnamate d'octyle	7,50%
Glycérine	5,00%
Phényltriméthicone	5,00%
Diméthicone copolyol	3,00%
Polyméthylméthacrylate	2,50%
Butyl méthoxydibenzoyl méthane	1,00%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1	2,00%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs, antioxydants	qs.
Eau	qsp. 100%

5 Ce sérum s'applique sur la peau quotidiennement pour traiter les personnes atteintes d'hyperpigmentations régionales.

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide comportant un nombre de nucléotides compris entre 7 et 25, de préférence égal à 20, capable de s'hybrider de façon spécifique avec les
5 gènes ou les produits des gènes codant pour la protéine kinase C beta-1 (PKC beta-1).
2. Oligonucléotide selon la revendication 1, capable de s'hybrider de façon spécifique avec une quelconque des régions 5' à 3', codante ou non codante des gènes codant pour la PKC bêta-1
- 10 3. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 ou 2, dont la séquence est l'une des séquences SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5 ayant la signification suivante :
 - SEQ ID N°1 : ACACCCCAGGCTCAACGATG
 - SED ID N°2 : TGG AGT TTG CAT TCA CCT AC
 - 15 - SEQ ID N°3 : AAA GGC CTC TAA GAC AAG CT
 - SED ID N°4 : GCC AGC ATC TGC ACC GTG AA
 - SED ID N°5 : CCG AAG CTT ACT CAC AAT TT
4. Oligonucléotide selon la revendication 3 dont la séquence est l'une des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°4.
- 20 5. Oligonucléotide selon la revendication 3 dont la séquence est SEQ ID N°1.
6. Oligonucléotide selon l'une des revendications précédentes, comprenant une ou plusieurs modifications chimiques au niveau de ses parties sucres, ses parties nucléobases ou son squelette internucléotidique, lesdites modifications conférant des caractéristiques physico-chimiques améliorées audit
25 oligonucléotide.
7. Oligonucléotide selon la revendication 6, caractérisé en ce que sa partie sucre comprend un substituant 2'-O-fluoro ou 2'-O-alkyle, préférentiellement un substituant 2'-O-éthylloxyméthyle ou 2'-O-méthyle.
8. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'une partie
30 des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements phosphorothioates.

9. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements méthylphosphonates.
10. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que tous les
5 groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements phosphorothioates.
11. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements méthylphosphonates.
- 10 12. Oligonucléotide selon les revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que les groupements phosphodiesters sont remplacés en tout ou partie par des groupements phosphorothioates et/ou par des groupements méthylphosphonates.
13. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 12 auquel on a greffé un
15 vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique ou peptidique, ou un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique.
14. Composition cosmétique contenant au moins un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 13 et un milieu cosmétiquement acceptable.
15. Composition cosmétique selon la revendication 14 contenant un ou plusieurs
20 agents actifs choisis parmi un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase ; un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1) ; l'acide ellagique et ses dérivés ; l'hydroquinone ; l'arbutine ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothénate
25 sulfonate et ses dérivés ; l'acide kojique ; les extraits placentaires ; des molécules interférant directement ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte stimulating hormone (α -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; les polyols tels que la glycérine le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques et/ou
30 desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique, seuls ou greffés ; l'acide ascorbique et ses dérivés ; les rétinoïdes et les caroténoïdes en

9. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'une partie des groupements phosphodiester de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements méthylphosphonates.
10. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que tous les groupements phosphodiester sont remplacés par des groupements phosphorothioates.
11. Oligonucléotide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que tous les groupements phosphodiester sont remplacés par des groupements méthylphosphonates.
12. Oligonucléotide selon les revendications 6 ou 7, caractérisé en ce que les groupements phosphodiester sont remplacés en tout ou partie par des groupements phosphorothioates et/ou par des groupements méthylphosphonates.
13. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 12 auquel on a greffé un vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique ou peptidique, ou un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique.
14. Composition cosmétique contenant au moins un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 13 et un milieu cosmétiquement acceptable.
15. Composition cosmétique selon la revendication 14 contenant un ou plusieurs agents actifs choisis parmi un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase ; un oligonucléotide antisens dirigé contre les produits d'expression du gène de la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1) ; l'acide ellagique et ses dérivés ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothénate sulfonate et ses dérivés ; des molécules interférant directement ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte stimulating hormone (α -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) ; les polyols tels que la glycérine le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique, seuls ou greffés ; l'acide ascorbique et ses dérivés ; les rétinoïdes et les caroténoïdes en préparation liposomique ou non, tels que le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses

- préparation liposomique ou non, tels que le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acétate, le bêta-carotène; des agents antiglycations et/ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses dérivés, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, la thiamine pyrophosphate, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate ; les agents apaisants et leurs mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc ; et les acides désoxyribonucléiques et/ou nucléiques.
16. Composition cosmétique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de la composition.
17. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 14 à 16 se présentant sous la forme d'une émulsion contenant une huile, un émulsionnant choisi parmi les esters d'acide gras et de polyéthylène glycol, tels que le stéarate de PEG-20, et les esters d'acide gras et de glycérine, tels que le stéarate de glycérine, et un co-émulsionnant.
18. Utilisation d'une composition selon les revendications 14 à 17 pour dépigmenter ou blanchir la peau, les poils et/ou les cheveux humains.
19. Utilisation d'un oligonucléotide selon les revendications 1 à 13 à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition cosmétique selon les revendications 14 à 17.
20. Utilisation d'au moins un oligonucléotide selon les revendications 1 à 13 à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition pharmaceutique topique destinée au traitement ou à la prévention des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmas idiopathiques, des hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires séniles (lentigo actiniques), des hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-

- dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acétate, le bêta-carotène; des agents antiglycations et/ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses dérivés, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, la thiamine pyrophosphate, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la
- 5 phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate; les agents apaisants et leurs mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc; et les acides désoxyribonucléiques et/ou nucléiques.
- 10 16. Composition cosmétique selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de la composition.
- 15 17. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 14 à 16 se présentant sous la forme d'une émulsion contenant une huile, un émulsionnant choisi parmi les esters d'acide gras et de polyéthylène glycol, tels que le stéarate de PEG-20, et les esters d'acide gras et de glycérine, tels que le stéarate de glycérine, et un co-émulsionnant.
18. Utilisation d'une composition selon les revendications 14 à 17 pour dépigmenter ou blanchir la peau, les poils et/ou les cheveux humains.
- 20 19. Utilisation d'un oligonucléotide selon les revendications 1 à 13 à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition cosmétique selon les revendications 14 à 17.
- 25 20. Utilisation d'au moins un oligonucléotide selon les revendications 1 à 13 à titre d'agent actif inhibiteur de la synthèse de la mélanine pour la fabrication d'une composition pharmaceutique topique destinée au traitement ou à la prévention des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmas idiopathiques, des hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires séniles (lentigo actiniques), des hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-lésionnelle, et pour le traitement de certaines leucodermies telles que le vitiligo.
- 30

lésionnelle, et pour le traitement de certaines leucodermies telles que le vitiligo.

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de ladite composition pharmaceutique topique.

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que le/les oligonucléotides selon l'invention représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de ladite composition pharmaceutique topique.

LISTE DE SEQUENCES

<110> LOUIS VUITTON MOËT HENNESSY (LVM)
<120> Oligonucléotides anti-PKC
<130> D21706
<160> 5
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Oligonucléotide
<400> 1
acaccccagg ctcaacgatg 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Oligonucléotide
<400> 2
tggagtttgc attcacctac 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Oligonucléotide
<400> 3
aaaggcctct aagacaagct 20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Oligonucléotide
<400> 4
gccagcatgt gcaccgtgaa 20

<210> 5

<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Oligonucléotide

<400> 5
ccgaagctta ctcacaattt

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .. 1 / 1 ..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

240959 D 21706 AD.

0315560

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

OLIGONUCLEOTIDE ET SON UTILISATION POUR MODULER L'EXPRESSION DE LA
PROTEIN-KINASE C ISOFORME BETA-1 COMME AGENT DE DEPIGMENTATION CUTANEE

LE(S) DEMANDEUR(S) :

L V M H RECHERCHE : 20, avenue Hoche 75008 PARIS FRANCE - FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom

Prénoms

KURFURST Robin

Adresse

Rue

553, rue de Couasnon

Code postal et ville

45160 OLIVET

Société d'appartenance (facultatif)

2 Nom

Prénoms

NIZARD Carine

Adresse

Rue

31, rue Raspail

Code postal et ville

94200 IVRY SUR SEINE

Société d'appartenance (facultatif)

3 Nom

Prénoms

Adresse

Rue

Code postal et ville

Société d'appartenance (facultatif)

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

L. WARCOEUR
30.12.2003
11257



